

魚皮リポキシゲナーゼに関する研究

著者	毛利 哲
号	450
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/16828

氏 名(本籍)	も う 利 さとし 毛 利 哲
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 4 5 0 号
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学 位 論 文 題 目	魚皮リポキシゲナーゼに関する研究

論文審査委員(主 査)	教 授 藤 本 健四郎
	教 授 安 元 健
	教 授 大久保 一 良

論文内容要旨

第1章 緒 言

リボキシゲナーゼ (LOX、EC 1. 13. 11. 12) は、動植物界に広く分布しており、分子状酸素の付加により、シス、シス-1、4-ペンタジェン構造をもつ不飽和脂肪酸の過酸化を触媒する。食品化学的立場からは、脂質の酸化を促進するだけでなく、特に、植物性食品では、ヒドロペルオキシド (HPO) リアーゼの存在によってモノヒドロペルオキシドは分解し、オフフレーバーの原因となるアルデヒド類を生成することが知られている。また、動物のLOXは、最近になってアラキドン酸代謝物のロイコトリエン類が炎症のメディエーターとして作用することが注目されており、多様な生体内調節反応との関連が明らかになりつつある。

一方、魚類は様々な生理機能を有すると考えられているn-3系高度不飽和脂肪酸に富むなど有用な食品として注目されているが、反面、脂質の劣化が速いことおよび魚臭の発生などの原因で利用の拡大が進んでいないのが現状である。

魚類の脂質劣化機構は、おもにヘムタンパク質をはじめとする金属が触媒するものと考えられているが、近年、当研究室のChoらによって、マイワシの皮部に、熱に不安定な脂質過酸化促進物質が存在しており、ヘムタンパク質を多く含んでいる血合肉における活性よりも高いことが示されている。また、Hsiehらによっても、数種類の魚の皮部およびエラ部に脂質酸化促進活性が存在しており、マスのエラではアラキドン酸12-LOXがあること、および短鎖のアルデヒド類の生成に関与することが示されている。しかし、数種の魚皮で酸化促進酵素の存在が示されているものの、魚皮には非酵素的酸化促進物質も存在しているため、酵素的特性が明らかになっておらず、それらが本当にLOXであるかの証明もされていない。

そこで本研究では、これらの脂質酸化促進物質を精製、諸性質を検討し、LOXであることの証明を行った。また、魚臭の生成機構解明に重要と考えられるHPOリアーゼ活性の存在および諸性質の検討を行った。

第2章 マイワシ皮中に存在するリボキシゲナーゼ様酵素の精製

新鮮なマイワシ (*Sardinops melanostictus*) の皮をとり、0.05Mリン酸ナトリウ

ム緩衝液 (pH 7.0) で抽出して粗酵素液を得た。粗酵素液は、3 種類のカラムクロマトグラフィー (Sephadex G-200, CM Sephadex C-50、ヒドロキシアパタイト) に供した。それぞれの活性画分を集めて精製を行ったところ、Native-PAGE 上、単一のバンドを与えるタンパク質を得ることができ、最終的に約1400倍まで精製され、活性回収率は 1.3% であった (Fig. 1~4, Table 1)。

第3章 マイワシ皮におけるリボキシゲナーゼの存在とその諸性質

本タンパク質は分子量 18,000 のモノペプチドであり (Fig. 5)、また、100℃、10分の加熱で失活、至適 pH は7付近であり pH 6~10 の範囲で安定であった。

次に、各種の高度不飽和脂肪酸に対する反応性を酸素吸収により比較したところ、トランス型脂肪酸には全く作用せず、シス型脂肪酸に特異的に作用した。生体内に含まれる高度不飽和脂肪酸のうち、リノール酸および α -リノレン酸に対し高い活性を示し、エステル型脂肪酸に対する作用もみられた (Table 2)。これらのことから、本活性は、従来知られている LOX と比べて非常に特異であることが考えられた。これらの高度不飽和脂肪酸から生成する、HPO の立体選択性について検討した。リノール酸から 13 (S) -HPO を選択的に生成し、マイワシ皮中にリノール酸 13 (S) -LOX が存在していることが明らかになった (Fig. 6,7)。更に、EPA を基質とした場合 15-HPO が生成しており (Fig. 8)、マイワシ皮 LOX は、脂肪酸のメチル末端から6番目の炭素にヒドロペルオキシ基を導入する酵素であることが示された。

本酵素は、プロトヘム区をもつヘムタンパク質であり (Fig. 9)、金属キレート剤、ヘム阻害剤で阻害され (Table 3)、また、金属イオンによる活性安定化をうけた (Table 4)。また、補酵素類およびリン脂質により阻害された。特にリン脂質では、PE, PS および 18:1 をアシル基にもつものが強い阻害力を示した。(Table 5,6)

第4章 マイワシ表層粘液層リボキシゲナーゼの性質

新鮮なマイワシの表層粘液層を脱脂綿でふきとり、粘液層粗抽出液を得た。表層粘液層のリノール酸酸化促進活性は、皮そのもののそれよりも、タンパク質あたり約2倍近く高い値を示し (Fig. 10)、また、100℃、10分の加熱で半減、60分では完全に失活した (Fig. 11)。このことから、表層粘液層にも、加熱により失活する酸化促進物質が存在するものと考えられた。各種クロマトグラフィー上の挙動、およびリノール酸酸化生成物の立体選択性は、皮LOXと全く同一であり、本物質は、皮中に存在するLOXが粘液中に分泌されているものと予想された。

魚類の表層粘液は、外界からの防御機構をもつことが知られている。哺乳類のLOXの作用を考慮すると、魚皮中および表層粘液中のLOXは、防御機構としての役割を担っていることが予想された。

第5章 マイワシ皮ヒドロペルオキシドリアーゼの活性について

魚臭、特に鮮魚臭の成分は、主として脂質由来であると考えられている。一方、植物では、緑葉臭の発生に、LOX、HPOリアーゼ系が関与していることが既に報告されている。そこで魚臭の発生も本酵素系が関与しているのではないかと予想し、HPOリアーゼ活性の有無および諸性質を検討した。

13-c, t-リノール酸HPOと粗酵素液をインキュベートしたところ、加熱により失活するHPO分解促進活性がみられた (Fig. 12)。この反応により生成する揮発性物質を分析したところ、リノール酸HPO混合物を基質とした場合、ヘキサナールのみが生成した (Fig. 13)。この結果、基質であるHPOの分解反応に選択性があるものと考えられ、酵素的に反応がおこなわれていることが示唆された。未酸化のリノール酸を基質とした場合、生成量は低くなるが、同様にヘキサナールのみが生成し、リノール酸から、LOXによる13-HPOを経て、更に、HPOリアーゼによってヘキサナールが酵素的に生成することが予想された。

LOXと同一のタンパク質であるのかどうかを検討するため、カラムクロマトグラフィーにより部分精製を行った。ゲル濾過では、分子量15,000から30,000の画分にHPOリアーゼ活性は集中しており、陽イオン交換カラム上でも、LOX活性と

完全に一致していた (Fig. 14、15)。また、HPOリアーゼ活性の至適pHは中性付近であり皮LOXと一致していた。これらのことから、LOXとHPOリアーゼは、同一タンパク質であることが考えられた。

また、HPO分解反応が進行しているとき、284 nmの吸収が経時的に増大した (Fig. 16)。LOX反応生成物は最終代謝産物として280 nm付近に吸収をもつ様々な物質になることが知られており、マイワシ皮中でもこのような反応がおこっているものと考えられた。

ヘキサナールの生成に伴いヘキサノールの生成も認められ、アルコールデヒドロゲナーゼの存在も予想された。

これらの結果から、マイワシ皮中のフレーバー生成酵素系の存在が明らかとなった。

総括

マイワシ皮中に存在する熱失活性の脂質酸化促進物質は、3種類のカラムクロマトグラフィーによって精製され、その諸性質を検討した結果、リノール酸から1,3(S)-ヒドロペルオキシドを選択的に生成することなどから、リボキシゲナーゼであることが示された。しかし、マイワシ皮リボキシゲナーゼは、ヘム蛋白質であると予想されること、およびC₁₈脂肪酸に強く作用し、またエステル型脂肪酸にも作用することから、従来知られている動物リボキシゲナーゼに比べ非常に特異な性質を示した。表層粘液中にも、皮中のものと同様の性質をもつ脂質酸化促進物質が存在しており、皮リボキシゲナーゼは分泌されて、生体防御機構としての役割を担っていることが予想された。マイワシ皮中には、1,3-ヒドロペルオキシドを分解し、ヘキサナールを選択的に生成するヒドロペルオキシドリアーゼ活性も存在しており、魚臭の発生に関連があると思われる。本リアーゼ活性は、リボキシゲナーゼと同一タンパク質により反応が行なわれていることが示された。

本結果から、劣化の速い皮部の脂質酸化は、本酵素系によって開始され、魚臭の生成や品質の劣化の原因となっていることが予想された (Fig. 17)。

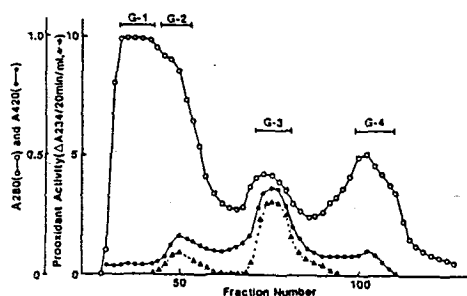


Fig. 1. Elution profile of sardine skin extract from Sephadex G-100 gel filtration (2.5x90cm, 5ml each)

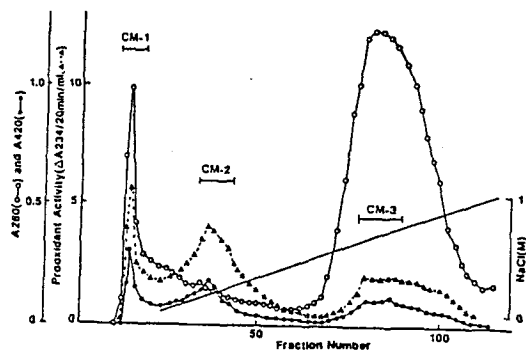


Fig. 2. CM-Sephadex C-50 chromatogram of G-3 fraction (1x20 cm, 10mM phosphate buffer (pH6.0), 2.5ml each)

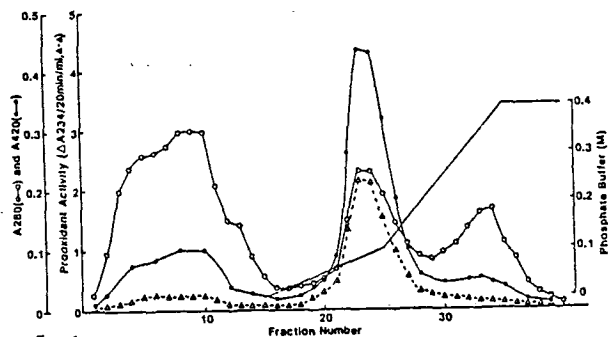


Fig. 3. Hydroxyapatite chromatogram of CM-2 fraction (1x5 cm, 10-400 mM phosphate buffer (pH6.0), 1ml each)

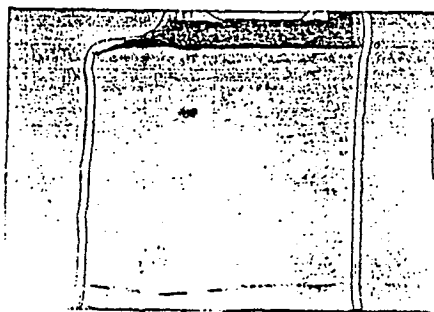


Fig. 4. Native-polyacrylamide gel electrophoresis of sardine skin prooxidant.

Table 1. Purification process of sardine skin lipoxigenase.

	total protein mg	total units ($\Delta A_{280}/20\text{min.}$)	recovery %	specific activity	concentration
crude extract	3100	1700	100	0.44	1
Sephadex G-200	86	1010	59	11.7	21.4
CM Sephadex C-50 CM-2	0.068	25.8	15	379	690
hydroxyapatite	0.030	23.0	1.3	767	1393

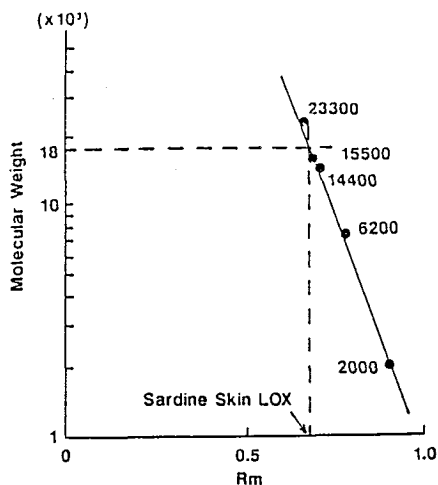


Fig. 5 Molecular weight of sardine skin lipoxigenase with SDS-PAGE

Table 2 Substrate specificity of sardine skin lipoxigenase

substrate	relative activity
linoleic acid	100
γ -linolenic acid	38
α -linolenic acid	113
arachidonic acid	45
eicosapentaenoic acid	22
docosahexaenoic acid	44
methyl linoleate	130
trilinolein	167
L- α -lecithin dilinoleoyl	30
<u>trans-9,trans-12,octadecadienoic acid</u>	0

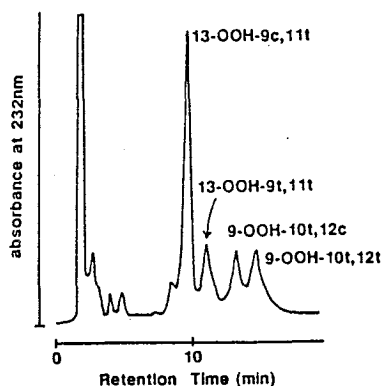


Fig. 6 HPLC analysis of methyl esters of hydroperoxide produced from linoleic acid by sardine skin lipoxigenase

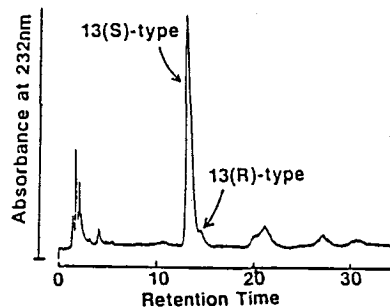


Fig. 7 Chiral Phase HPLC analysis of 13-hydroperoxide produced by sardine skin lipoxigenase

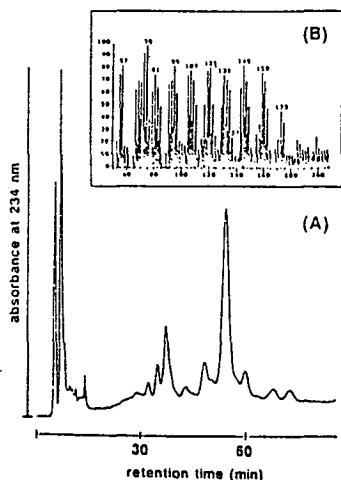


Fig. 8 HPLC analysis of methyl esters of hydroperoxides produced from EPA by sardine skin lipoxigenase

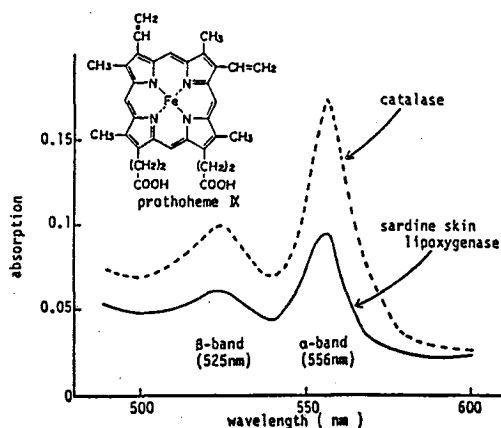


Fig. 9 Absorption spectrum of prothoheme X from sardine skin lipoxigenase in pyridine

Table 3. Effect of EDTA, o-phenanthroline, potassium cyanide and sodium azide on enzyme activity

Reagent	Concentration (mM)	Residual activity (%)
EDTA	0.1	69
	1	62
	10	60
	100	12
o-Phenanthroline	0.1	90
	1	34
	10	0
Potassium cyanide	0.1	92
	1	56
	10	18
	100	6
Sodium azide	10	100

Table 5. Effect of NADH, NADPH, phosphatidylcholine and ATP on enzyme activity

Reagent	Concentration (mM)	Inhibition (%)
NADH	0.1	6
	1	80
NADPH	0.1	20
	1	65
Phosphatidylcholine	0.1	10
	0.5	33
	1	50
ATP	1	9
	10	60

Table 4. Effect of Metal Ions on the Stability of Sardine Skin Lipoygenase.

metal	residual activity (%)
control*	100
none	57
CoCl ₂	52
MgCl ₂ · 6H ₂ O	84
CdCl ₂ · H ₂ O	95
FeCl ₂ · H ₂ O	116
CaCl ₂ · H ₂ O	84
CuSO ₄ · H ₂ O	45
ZnCl ₂	65
MnCl ₂ · 4H ₂ O	30

* Enzyme solution was kept at 4°C.

Table 6. Effect of various phospholipids on the enzyme activity

reagent	concentration (mM)	inhibition (%)
PC (egg)	0.01	0
	0.05	10
	0.1	50
PE (egg)	0.01	10
	0.05	70
	0.1	100
PI (soybean)	0.01	0
	0.05	0
	0.1	15
PG (porcine brain)	0.01	25
	0.05	100
	0.1	100
PC di-16:0	0.01	33
	0.1	20
PC di-18:1	0.01	50
	0.1	85
PC di-18:2	0.01	5
	0.1	0
PE di-18:0	0.01	0
	0.1	0
PE di-18:1	0.01	40
	0.1	80
PE di-18:2	0.01	0
	0.1	0
oleic acid	0.007	0
	0.07	70

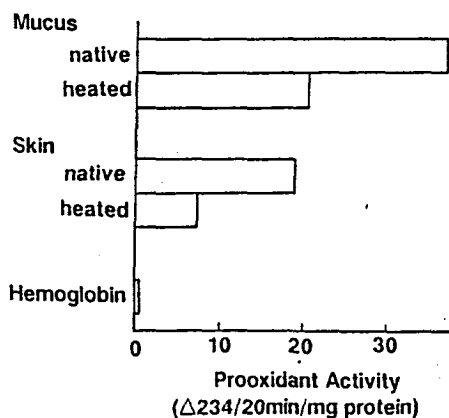


Fig. 10. Prooxidant activity of sardine mucus for linoleic acid.

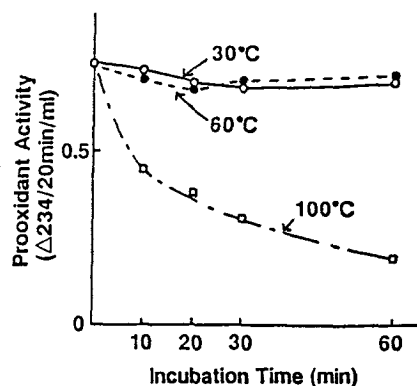


Fig. 11. Thermal stability of sardine mucus prooxidant.

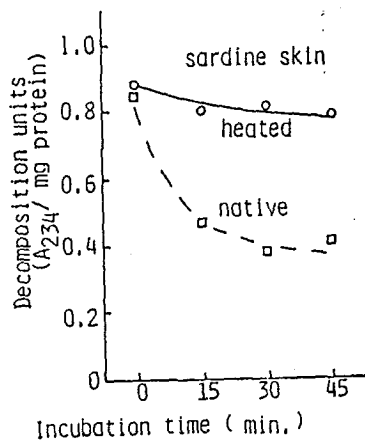


Fig. 12 Decrease of linoleate mono-hydroperoxide by sardine skin

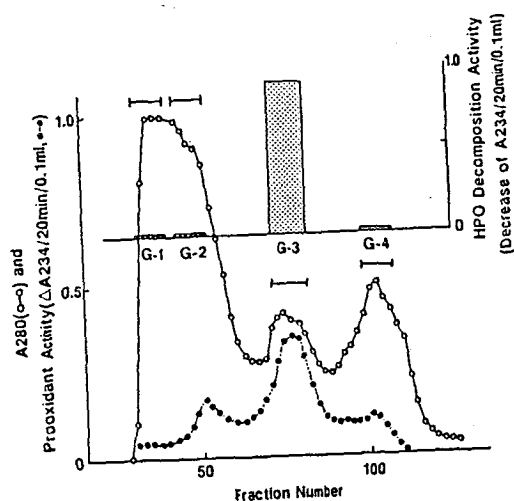


Fig. 14 Elution profile of sardine skin extract from sephadex G-100 gel filtration (2.5x90cm, 5ml each)

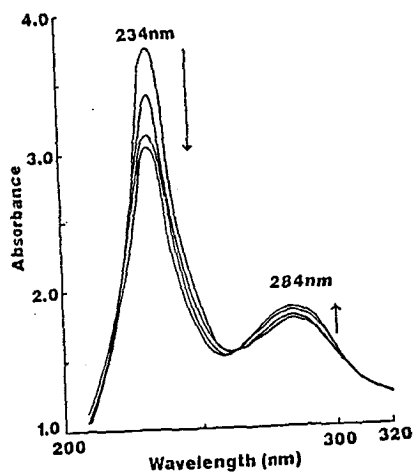


Fig. 16 Spectra of HPO decomposition by sardine skin HPO lyase from zero to 10 min.

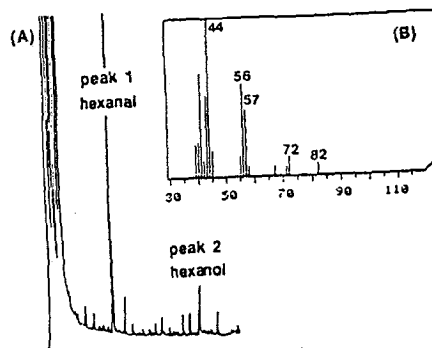


Fig. 13 Formation of hexanal from hexanal by sardine skin extract
(A) Gas chromatogram (B) Mass spectrum

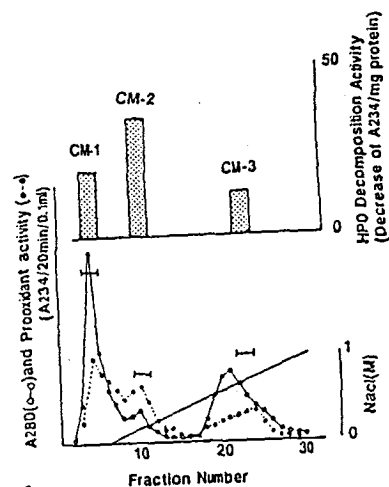


Fig. 15 CM-Sephadex C-50 chromatogram of G-3 fraction (1x20cm, 10mM phosphate buffer (pH 6.0), 2.5ml each)

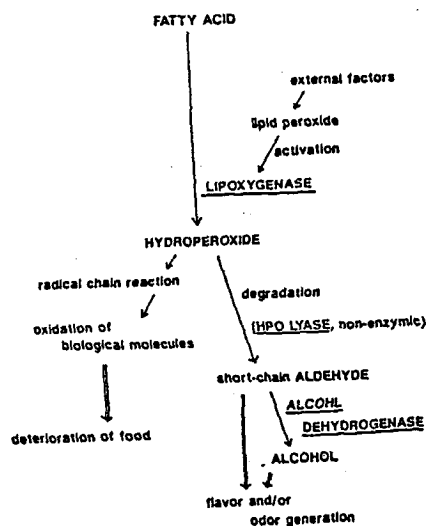


Fig. 17 Proposed reaction scheme of deterioration and flavor generation in fish skin.

審査結果の要旨

リポキシゲナーゼは、多価不飽和脂肪酸に二原子酸素を添加し、過酸化脂質（ヒドロペルオキシド）を生成する酵素で、植物性食品では、異臭の発生、色素の分解など品質劣化に大きく関わっている。一方、動物組織での発見は比較的遅く、その研究は生化学的なものがほとんどである。食品として利用される動物組織中にも、脂質過酸化促進因子の存在することは知られているが、その活性は主としてヘムたんぱくによる非酵素的なものと考えられてきた。魚類は、高度不飽和脂肪酸に富むため、脂質酸化は大きな問題であるが、魚類でのリポキシナーゼの存在は、非可食部の鰓で明らかにされたに過ぎない。本研究室では、前にマイワシ皮に熱に不安定な酵素様脂質過酸化活性の存在を認めたが、本活性がリポキシナーゼによるものかどうかは不明であった。本論文では、本活性がリポキシナーゼであることを明らかにし、精製により、構造、反応性共、一般のリポキシナーゼとは異なる特異な性質を有することを初めて明らかにしたものである。

本研究では、まず始めにマイワシ皮から脂質過酸化活性を指標として精製を行い、SDS電気泳動で単一バンドを与える活性画分を得た。本標品は、リノール酸を酸化して、13-Z, E-ヒドロペルオキシドのみを与えた。さらに、本酵素は、立体選択的に酸素を付加（S型）したので、リポキシナーゼであることが確認された。本酵素は、遊離脂肪酸だけではなく、トリグリセリド等のエステル脂質も同様に酸化し、長鎖脂肪酸よりもC18酸に活性が高かった。これらは、動物リポキシナーゼとしては他に例のないものである。構造的には、本酵素はプロトヘムⅩを持っており、高等動植物の既知リポキシナーゼがすべて非ヘム鉄を含んでいる点と比較して、極めて特異であった。

本酵素と同じ活性が、皮粘液層に見いだされたことから、本酵素は粘液に分泌され、防御機構を担っていることが推定された。さらに、本酵素はヒドロペルオキシドリアーゼ活性も有しており、短鎖のアルデヒドの生成も触媒するところから、魚臭発生への関与が示唆された。

以上の結果は、マイワシを始めとする生鮮魚類の脂質劣化機構のみならず、リポキシナーゼについても貴重な新知見を加えるものであり、著者に博士（農学）の学位を授与する価値があるものと判定した。